
学 位 論 文

Streptococcus mutans の Quorum Sensing System に関する研究

藤坂 菊美

キーワード: *S. mutans*, Quorum Sensing System, CSP

Study on a Quorum-sensing System of *Streptococcus mutans*

Kikumi FUJISAKA

Abstract : Genetic competence in *S. mutans* is regulated by a quorum-sensing system mediated by a competence-stimulating peptide (CSP). CSP encoded by the *comC* gene is involved in competence for genetic transformation and biofilm formation. The quorum-sensing system in *S. mutans* involves four gene products encoded by *comC*, *comD*, *comE* and *comX*. The *comC*, *comD* and *comE* genes encode a CSP precursor, its histidine kinase sensor protein, and a cognate response regulator, respectively. The loci of *comC* and *comDE* lie adjacent on the chromosome. *comX* encodes a sigma factor, however little is known about the influence that the quorum-sensing system has on the pathogenicity of *S. mutans*. It is of interest to verify the roles of the quorum-sensing system in *S. mutans* for its ability to form a biofilm. To test this hypothesis, *S. mutans* wild-type strain UA159 and its knockout mutants, which were defective in *comC*, *comD*, *comE* and *comX* mutant, were examined for their ability for initial adhesion, glucan synthesis and invasion into dentinal tubules. The initial adhesion ability of *S. mutans* cells to saliva-coated hydroxyapatite was decreased in *comD* and *comE* mutant strains. This result shows that the quorum-sensing system already has an influence on initial biofilm formation to be adherent or the early phase of carious formation.

The proportions of water-insoluble glucan synthesis in all mutant strains were less than the wild type. The proportions of water-soluble glucan adhering to dentin slices in all mutant strains were also less than in the wild type. The total dose of three kinds of glucan composition decreased in all mutant strains. The expansion rates of dentinal tubules by *comC*, *comD*, *comE* and *comX* mutant increased more than by the wild type when cultured in brain heart infusion for 24 days. This study demonstrated that the quorum-sensing system may play a crucial role in initial adhesion, glucan synthesis, biofilm formation and invasion to dentinal tubules of *S. mutans*.

緒 言

口腔内には多種多様な細菌が常在しており、その一部は歯面へ付着し定着する。定着した細菌は、唾液成分や摂食による栄養分などを取り込みバイオフィームであるプラークを形成する。プラークは口腔内においていくつかの疾患を引き起こすが、代表的なものの一つが齲蝕である。齲蝕は歯の表面に形成されたプラーク中に細菌の産生する酸が貯留し、歯の表面を脱灰することで開始される¹⁾。プラークを構成する細菌の一つである *Streptococcus mutans* は、不溶性グルカンの産生による歯面への付着能を有し、齲蝕誘発能が高いことが知られている。また ATP を利用したプロトンポンプにより、急激な pH 低下に対する耐酸性を有することも知られている²⁾。 *S. mutans* UA159 株の全遺伝子配列は2002年に解読されたが、多様な糖代謝に関連する遺伝子、歯面への付着に関連する遺伝子、あるいは耐酸性に関連する遺伝子など、齲蝕の形成において重要な役割を果たす遺伝子が多いのが特徴的とされている³⁾。

細菌は、Quorum Sensing System と呼ばれる細菌間密度探知機構を利用して菌の集合体の中における個々の細菌の遺伝子発現を制御している^{4,6)}。細菌が分泌するオートインデューサーと呼ばれるシグナル分子によって周囲の菌濃度を感知し、この分子が一定の濃度を超える

と標的遺伝子が活性化され、種々の環境ストレスに適応するといわれている⁷⁾。細菌には、菌種特異性が保たれているオートインデューサー 1 と菌種特異性の低いオートインデューサー 2 が存在する。また、Quorum Sensing System は、グラム陽性菌にもグラム陰性菌にも様式が異なるが、広く存在している^{8,9)}。 *S. mutans* のオートインデューサー 1 は、21個のアミノ酸からなるオリゴペプチドで competence-stimulating peptide (CSP) と呼ばれる¹⁰⁾。CSP は *comC* 遺伝子によってコード化されており、transporter を介して細胞膜を通過し菌体外に分泌され、receptor である ComD に結合する。この刺激により response regulator である ComE がリン酸化され、さらにその刺激が菌体内部に伝達され、*comC*、*comD*、*comE* 遺伝子およびシグマファクターである *comX* 遺伝子の発現が制御されている¹¹⁻¹³⁾ (図 1)。

S. mutans の病原性のうちバイオフィームの形成および耐酸性に Quorum Sensing System が関与していることが報告されている^{11,14-16)}。Quorum Sensing System が発動すると、細菌はトランスフォーメーションが容易な状態になり、環境変化に適応する種々の遺伝子を発現し、またそれに応じた代謝調節など行われることが報告されている¹⁷⁾。しかしながら、*S. mutans* が歯面に形成されたバイオフィーム内で Quorum Sensing System による特異的

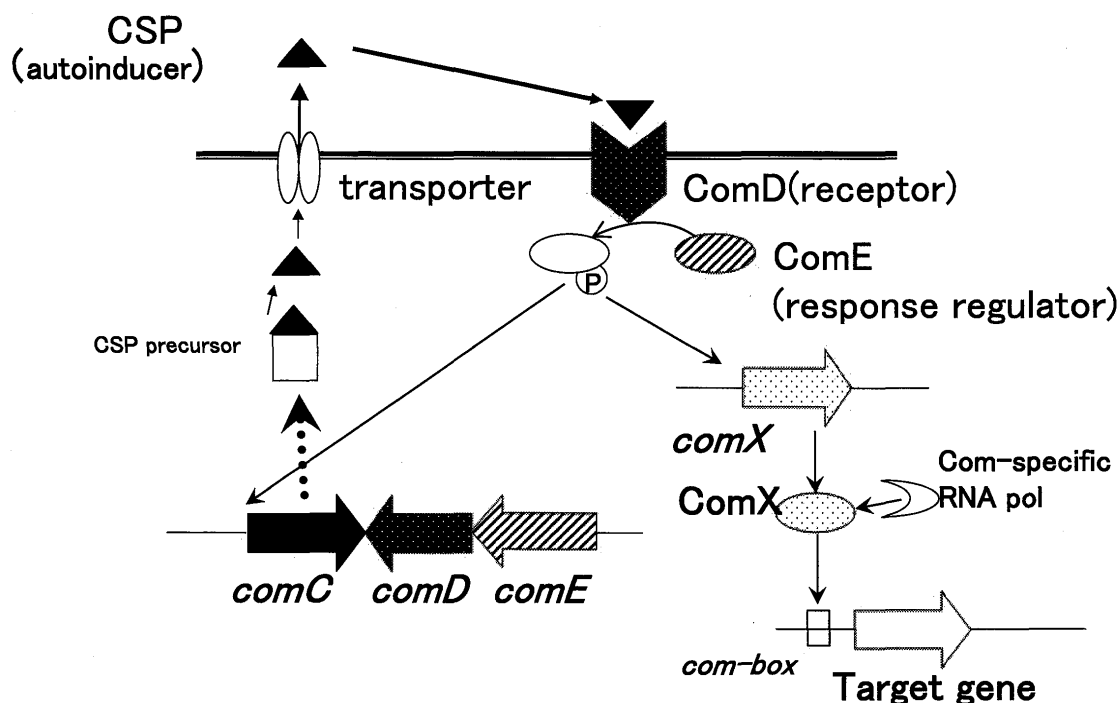


図 1 *S. mutans* の Quorum Sensing System

S. mutans のオートインデューサーは、21個のアミノ酸からなるオリゴペプチドで、competence-stimulating peptide (CSP) と呼ばれる。CSP は *comC* 遺伝子によってコード化されており、transporter を介して細胞膜を通過し菌体外に分泌され、receptor である ComD に結合する。この刺激により response regulator である ComE がリン酸化され、さらにその刺激が菌体内部に伝達され *comC*、*comD*、*comE* 遺伝子およびシグマファクターである *comX* 遺伝子発現が制御されている。

な遺伝子発現や代謝制御を行なっているかどうかは、明らかになっておらず、また、バイオフィーム形成以外の齲蝕病原性因子に与える影響は、未だに分かっていない。

そこで、今回 *S. mutans* のバイオフィーム形成機序における Quorum Sensing System の関連性についての基礎的知見を得ることを目的として、種々の *com* 遺伝子を改変した株を用いて *S. mutans* の歯面への付着、グルカンの合成、あるいは象牙細管への侵入といった齲蝕病原性因子に Quorum Sensing System が、どのような影響を及ぼすのかを検討した。すなわち、CSP をコードする *comC* 遺伝子、receptor の *comD* 遺伝子、response regulator の *comE* 遺伝子、response regulator に活性化されるシグマファクターである *comX* 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変株を作製し、それらを用いて初期付着能・グルカン合成量・象牙細管への侵入能を解析した。

材料と方法

1. 使用菌種およびプラスミド

S. mutans UA159 株、および *S. mutans* UA159 株を親株とし、*comC*、*comD*、*comE*、*comX* 遺伝子を改変した株を作製し、これらを使用した。遺伝子改変株の作製に使用した菌株ならびにプラスミドを表 1 に示した。

Escherichia coli の培養は、Luria-Bertani (LB) broth (インビトロジェン、東京) を使用し、37℃にて行った。親株はブレインハートインフュージョン (以下 BHI と略す; BD 社、東京) 液体培地にて、また各改変株においてはエリスロマイシン (和光純薬、大阪) 10 µg/ml を含む液体培地にて培養した。

2. 相同組み換え改変株の作製

1) 改変株の作製

制限酵素の使用やライゲーション、トランスフォーメーションなどの DNA は取り扱いに関しては通法に基づいて行った。Polymerase chain reaction (PCR) はすべて 35 サイクルで行い、アニーリング温度は表 2 に示した。*S. mutans* UA159 株の染色体上の *comC* 構造遺伝子内に設定したプライマー (*comC*-2s, *comC*-2a, 表 2) を用いて PCR を行った。次に、増幅 DNA 断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を用いて精製した後、pBR322 vector に挿入し、さらに *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) へトランスフォーメーションすることにより pBR322-*comC* を得た。一方、pBE31 (ヤクルト・バイオサイエンス研究財団、東京) よりエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子を PCR クローニングし、pACΩGm¹⁸⁾ より PCR クローニングした Ω フラグメントとライゲーションし、Em^r カセットを得た。その後、PBR322-*comC* を制限酵素 *Dra* I にて切断後、Em^r カセットを挿入し、pCR2.1TOPOΩEm^r-*comC* を得た。この pCR2.1TOPOΩEm^r-*comC* を *Sph* I で切断後、*S. mutans* UA159 株の染色体上の *comC* 遺伝子

表 1 使用菌株とプラスミド

Strain and Plasmid	Relevant characteristics
<i>S. mutans</i>	
<i>S. mutans</i> UA159	Wild type
Plasmid	
pGEM-T	Ap ^r and TA-cloning vector
pCR2.1 TOPO	Ap ^r Km ^r and TA-cloning vector
pBR322	Ap ^r Tc ^r and TA-cloning vector
pACΩGm	pACYC184 derivative carrying Ω fragment, Gm ^r
pBE31	Em ^r shuttle vector
pCR2Em	pCR2.1Topo derivative carrying Ω fragment, Em ^r
pcomCΩEm	<i>comC</i> ::Em ^r pBR322 vector
pcomDΩEm	<i>comD</i> ::Em ^r pBR322 vector
pcomEΩEm	<i>comE</i> ::Em ^r pBR322 vector
pcomXΩEm	<i>comX</i> ::Em ^r pBR322 vector

表 2 改変株作製に使用したプライマー

Strain	Primer	Sequence	Annealing temperature
<i>comC</i> (-) mutant	<i>comC</i> -2s <i>comC</i> -2a	5' TCCGCCGGGGGAACATTCTTTTCTCCTTTATTC 3' 5' GGAAATTCGTGAATAATAATGACGCTTG 3'	55℃
<i>comD</i> (-) mutant	<i>comD</i> -1s <i>comD</i> -1a	5' ACTGAGAGCTGTGATTGCTG 3' 5' GCTGTGCTGGATGAGAAG 3'	44℃
<i>comE</i> (-) mutant	<i>comE</i> -1s <i>comE</i> -1a	5' GCQAATAGATAAGTAGGGT 3' 5' CTAACAAGTCAGAAGCTGG 3'	40℃
<i>comX</i> (-) mutant	<i>comX</i> -1s <i>comX</i> -1a	5' GGGACATTTATGCTCTGTTC 3' 5' AGGTTTGACCAAAACAC 3'	44℃

との間で相同組み換えを起こさせることにより、Em^r 遺伝子挿入型の *comC* 遺伝子改変株を作製した。同様の方法で *comD*、*comE*、*comX* 遺伝子改変株を作製した。相同組み換えの確認は改変株のゲノム DNA を精製した後、PCR を行った。さらに、この PCR 断片を用いてサイクルシーケンシングを行い、ABI PRISM3100-Avant (Applied Biosystems, Inc., USA) 用いて塩基配列を解析することにより、相同組み換えを確認した。

3. 増殖能の測定

親株、改変株を BHI あるいは 10 µg/ml の Em を含む BHI にて培養し、経時的に生菌数の測定および OD₅₉₅ の測定を行い、増殖能を測定した。

4. 初期付着への影響に関する検討

1) ハイドロキシアパタイトへの唾液のコーティング処理

唾液の処理は、Gaines¹⁹⁾ と Koga²⁰⁾ の方法に準じて行った。すなわち、唾液はヒトの全唾液を回収し-80℃にて凍結した後、タンパク分解酵素などの酵素活性を失活させるために 60℃で 30 分間処理し、その後に遠心 (12,000 × g, 20 分間) し、上清を回収した。得られた上清を限外濾過 (4,000 × g) し、さらに 0.25 µm のフィルターにて濾過滅菌を行った。以上の処理をした唾液に、エチレンオキシドガス (以下 EOG と略す) 滅菌したハイド

ロキシアパタイト板 (PENTAX 社, 東京, 以下 HA 板と略す) を24時間浸漬することにより, 唾液のコーティング処理を行った。処理を終えた HA 板を用いて, *S. mutans* の親株ならびに遺伝子改変株の初期付着能を計測した。

2) 菌の培養及び付着率の測定

親株および改変株を 2×10^7 cfu/ml になるように生理食塩水にて調製し, 唾液コーティングをした HA 板上に 30 μ l 加え, 5 分間静置した。その後に PBS にて洗浄し, 0.25% トリプシンを含んだ生理食塩水にて回収し, *mitis salivarius* 培地 (BD 社, 東京) にプレーティングし, 24 時間後に生菌数を測定した。付着率は, HA 板上に加える前の生菌数に対する 5 分後の生菌数の割合で計算した。

5. 疎水性の測定

親株と改変株の定常期の菌を使用し, 疎水性を測定した。疎水性の測定は, Rosenberg ら²¹⁾の方法に準じて行った。菌を遠心 (3,000 \times g, 5 分間) にて集菌した後, リン酸マグネシウム・尿素緩衝液 (以下 PUM と略す) にて洗浄した後にさらに PUM 緩衝液にて OD₆₄₀ が 0.5 になるように調製した。次に, 調製した菌液へ 200 μ l のデカン (和光純薬) を加えて攪拌した後に 5 分間静置し, OD₆₄₀ を測定した。疎水性は, デカンを加える前後の吸光度の減少率で評価した。

6. 試験管への付着率の測定

スクロースを利用した試験管への付着について親株および改変株で測定した。試験管への付着率の測定は, Hamada ら^{22, 23)}の方法に準じて行った。親株および改変株の対数増殖期の菌を遠心 (6,000 \times g, 20 分間) にて集菌した後に, カリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8; 以下 KPB と略す) にて OD₆₀₀ が 0.6 になるように菌液を調製した。試験管に調製した菌液 2 ml と 5% スクロース 2 ml を混合し, 水平から 30 度に傾けて 37 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させた。反応終了後, 試験管を静かに回転させ, 付着していない菌体を含んだ溶液を第二の試験管へ移した。菌体が付着している第一の試験管に KPB 3 ml を加え, 第二, 第三の試験管ともに超音波処理して均一な浮遊液とし, OD₅₅₀ を測定した。付着率は第一の試験管の OD₅₅₀ / (第一 + 第二 + 第三の試験管の OD₅₅₀) \times 100 で計算した。

7. PAc (Protein Antigen Serotype C) の発現に関する検討

1) ELISA 法による菌体表層タンパク質抗原である PAc の発現解析

96 穴プレートに親株及び各 *com* 遺伝子改変株の定常期の菌を固着させ, 抗 PAc モノクローナル抗体 (徳島大学 Eleanor J. FERNANDERZ 博士より恵与²⁴⁾) を一次抗

体として添加後, HRP マウス抗 IgG 抗体を二次抗体として反応させた。波長 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて発現量を測定することで PAc の発現量を解析した。

2) Real-time PCR による PAc をコードする *spaP* の発現量の定量

PAc をコードする *spaP* 遺伝子²⁵⁾ の発現量を Real-time PCR 法にて測定した。RNA の抽出は Ono ら²⁶⁾の方法に準じて行った。親株および改変株の定常期の菌液を回収し, ムタノリシン (シグマアルドリッチジャパン, 東京) で処理した後, RNeasy spin column (QIAGEN) を使用し, total RNA を抽出した。次に, RQ1 RNase-Free Dnase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) にて DNase 処理を行い, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (ロシュダイグノティクス, 東京) を用いて逆転写反応を行った。Real-time PCR による遺伝子発現測定には LightCycler (ロシュ社) を用い, 試薬は LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBRgreen I (ロシュ社) を用いた。使用したプライマーおよび条件を表 2 に示した。なお, 内部標準として, 16s rRNA 遺伝子の発現量を測定し, それに対する各遺伝子の相対的な発現量を測定した。また, 親株の発現量を 1 とし, それぞれの改変株の発現を算出した。

8. グルカン合成量の測定

1) ウシ象牙質試料の調製

ウシ象牙質試料の調整は末延の方法²⁷⁾を用いて行った。すなわち, 自然解凍したウシ前歯の解剖学的歯頸線よりその歯冠部を切断し, 軟組織と歯髄を除去した後, 歯根部において歯軸方向に平行に約 500 μ m の厚さの象牙質試料を ISOMETTM 低速切断機 (以下 ISOMET と略す; Buehler Co. Ltd., LakeBluff, IL, USA) を用いて作製し, タービンにてダイヤモンドポイントを用いて 3 \times 7 mm にトリミングし, 注水下にて #600, #800, #1000, #1500 の耐水研磨紙を用い, さらに粒度 3 μ m, 1 μ m の研磨紙を使用し, 厚さ 300 μ m の厚さまで手研磨した。その試料を 17% EDTA 水溶液中で 4 分間の超音波処理を行った後, 滅菌水中で 10 分間超音波洗浄し, さらに滅菌水で 12 時間, 室温で振盪させながら水洗し, ウシ象牙質試料を作製した。それらを 48 穴プレートへ一枚ずつ約 20 $^{\circ}$ に傾斜させて入れ EOG 滅菌後, 各プレートに BHI 液体培地 600 μ l および対数増殖期の親株あるいは *com* 遺伝子改変株を 100 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C にて 48 時間培養した。

2) グルカン合成量の測定

培養後, プレートより象牙質板を取り出し, 滅菌水にて洗浄し, 象牙質板へ付着した不溶性グルカンを 0.5N NaOH で溶解させた。一方, 培養液は遠心 (6,500 \times g, 20 分間) することにより培養液中の不溶性グルカンおよび水溶性グルカンに分離した。不溶性グルカンは滅菌水で 2 回洗浄し, 0.5N NaOH 500 μ l で溶解させた。また水

溶性グルカンは50%エタノールを加え遠心(6,500×g, 20分間)により沈殿させた後, 0.5N NaOH 500 µl で溶解させた。NaOH で溶解させた各試料は遠心(6,500×g, 20分間)後, 上清をフェノール硫酸法^{28, 29)}にてグルカン量の測定を行った。すなわち, 合成グルカンを0.5N NaOH 500 µl にて溶解後, グルカン溶液 30 µl に10%フェノール水溶液を 30 µl 添加, その後濃硫酸を100 µl 添加し, 波長 490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad Laboratories)にて測定した。得られた吸光度は濃度を規定したグルコース溶液(150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 0 µg/ml)を基に作製した標準曲線を用いて, グルカンの濃度に換算した。

3) Real-time PCR による *gtfB*, *gtfD* ならびに *dexA* の mRNA 定量

Real-time PCR により, 7.2)と同様の方法で total RNA の抽出および逆転写反応を行い, グルカン合成に関与している *gtfB*³⁰⁾ と *gtfD*³¹⁾ およびグルカン分解に関与している *dexA*³²⁾ の mRNA の発現を定量した。使用したプライマーは表2に示す。

9. 象牙細管への侵入状態の観察

1) ウシ人工齲蝕象牙質試料の調製

自然解凍した凍結ウシ前歯の解剖学的歯頸線付近よりその歯根部を切断し, 軟組織と歯髄を除去した後, 歯冠部において唇側より歯軸方向に垂直に約 500 µm の厚さの象牙質試料を ISOMET を用いて作製した。8.1)と同様な方法で研磨および水洗し, 20 ml 試験管中にワイヤーで懸垂して EOG 滅菌した。滅菌の終わったウシ象牙質板を対数増殖期の親株と改変株を培養液中に浸漬し, BHI で2日ごとに培地を交換しながら24日間培養した(培養条件①)。この試料の一部を Trypticase® Soy Broth without Dextrose (以下 D(-)TSB と略す)に移し2日間培養し(培養条件②), さらにその一部を5%スクロースを添加した D(-)TSB (5% S-D(-)TSB)に移し2日間培養した(培養条件③)。

2) 試料の処理並びに象牙細管径の増大率の測定

培養終了後, ウシ人工齲蝕象牙質試料は2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1M カコジル酸緩衝溶液(pH 7.4)中で前固定した後, 1.3%四酸化オスミウム酸溶液にて後固定を行い, 上昇エタノール系列で脱水後, エポキシ樹脂(Quetol 653, 日新 EM 社, 東京)に包埋した(加熱重合60℃, 48時間)。続いて得られたブロックから象牙細管が可及的に縦断されるように準薄切片を作製し, トルイジンブルーにて染色後, 光学顕微鏡(U-PS, OLYMPUS, 東京)および撮影装置(CAMEDIA, OLYMPUS)を用いて, 観察部位のデジタル画像を得た。次に, 菌の侵入が認められる象牙細管と認められない象牙細管の最大幅径を NIH Image (ver.1.62, National Institutes of Health, USA)を用いて測定し, 象牙細管の直径の菌の侵入による象牙細

管の増大率を算出(図2)し, 各培養条件間で比較した。

10. 統計学的解析

付着率の測定, mRNA 発現, ELISA 法の測定, グルカン量の測定, 象牙細管の増大率の測定における実験結果は, 平均±標準偏差で表し, Student の t 検定を用いて統計学的処理を実施し, $p < 0.05$ にて有意差ありと判定した。

結 果

1. 親株および改変株の増殖能

S. mutans の Quorum Sensing System においてオートインデューサーである CSP をコードしている *comC* 遺伝子, CSP の receptor の *comD* 遺伝子, response regulator の *comE* 遺伝子, response regulator に活性化される *comX* 遺伝子の改変株を作製し, 各改変株の増殖曲線を作成した。親株と改変株の間で, 発育速度に特に大きな差は見られなかった(図3, 4)。

2. 親株および改変株のハイドロキシアパタイト板に対する初期付着の検討

口腔内におけるペリクルへの細菌の付着を再現するために, 唾液をコーティングした HA 板に対する初期付着を親株と改変株で比較し, 初期付着に対する Quorum Sensing System の影響を検討した。唾液コーティングした HA 板に対する初期付着は, *comD* 遺伝子改変株と *comE* 遺伝子改変株において親株の35~40%に有意に低下した(図5)。

3. 親株および改変株の疎水性の測定

菌体表面の疎水性の測定を行い初期付着への影響を検討した。親株と改変株の定常期の菌を使用し, 疎水性を測定した。親株に比べて, *comD* 遺伝子改変株が高い疎水性を示した(図6)。

4. 親株および改変株の試験管への付着率の測定

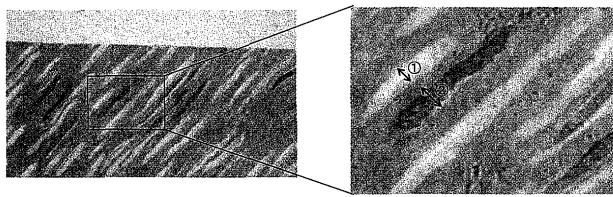
S. mutans の Quorum Sensing System を制御する遺伝子, すなわち *comC* 遺伝子, *comD* 遺伝子, *comE* 遺伝子, *comX* 遺伝子を改変させることで, スクロースを利用した試験管への付着に影響を及ぼすかどうか検討した。親株と比べて, *comC* 遺伝子改変株, *comD* 遺伝子改変株, *comE* 遺伝子改変株で有意にスクロースを利用した試験管への付着量が減少し, 特に *comC* 遺伝子改変株は親株の約25%に減少した(図7)。

5. 親株および改変株の PAc の発現解析

1) ELISA 法による PAc の発現解析

S. mutans の表層に存在するタンパク質で歯面への付着にとって重要な働きをしている PAc の発現を親株お

象牙細管における直径の増大率(%)の算出法



$$\frac{\text{②菌の侵入している細管の最大幅径}(\mu\text{m})}{\text{①菌の侵入していない細管の最大幅径}(\mu\text{m})} \times 100$$

図2 象牙細管における直径の増大率(%)の算出法
菌が侵入している象牙細管としていない象牙細管の最大幅径を NIH Image (ver.1.62, National Institutes of Health, USA) を用いて測定し、それらを比較し、菌の侵入による象牙細管の増大率を算出した。

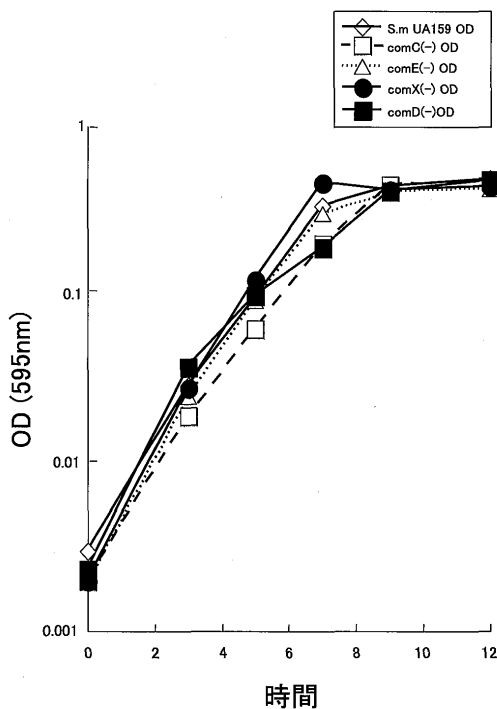


図3 親株および改変株の増殖曲線
親株および改変株の OD₅₉₅ を経時的に測定した。

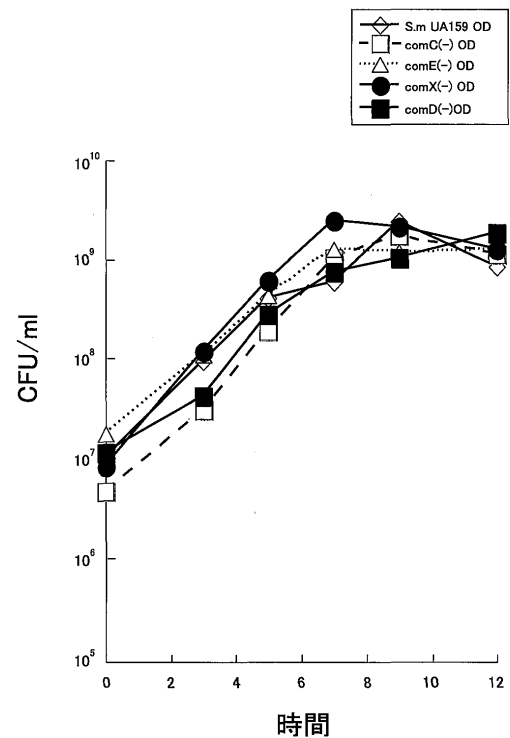


図4 親株および改変株の増殖曲線 (cfu/ml)
親株および改変株のコロニー数 (cfu/ml) を経時的に測定した。

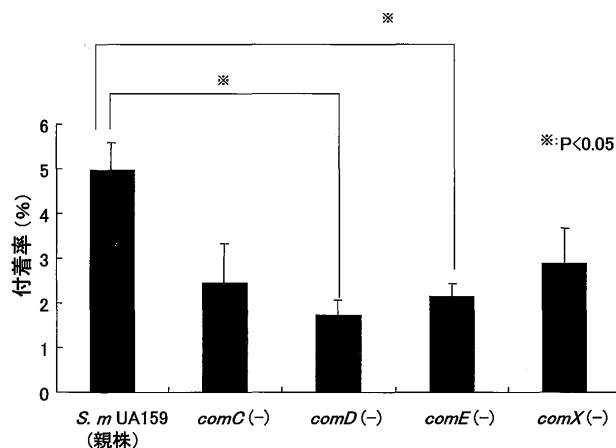


図5 唾液コーティングしたハイドロキシアパタイト板への初期付着率の比較

ヒトの唾液によるコーティング処理を行った HA 板を用いて、*S. mutans* の親株ならびに遺伝子改変株の初期付着能を計測した。親株、および改変株を 2×10^7 cfu/ml になるように調製し、唾液コーティングした HA 上に 30 μ l のせ 5 分間静置した後、PBS (+) にて洗浄し、0.25 % トリプシンを含んだ生理食塩水にて回収し、MS 培地に 100 μ l プレーティングし、24 時間後に cfu を測定した。付着率は HA 板上に加える前の cfu に対する 5 分後の cfu の割合で計算した。

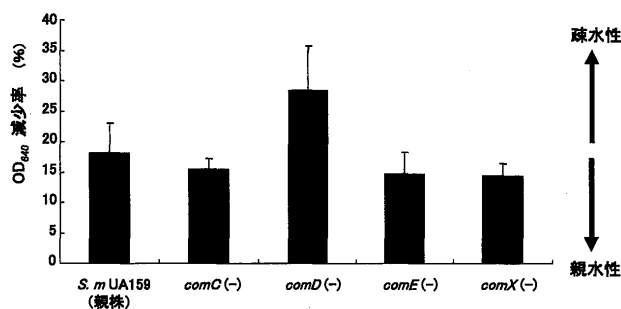


図6 親株と改変株の菌体表層の疎水性の比較

親株と改変株の定常期の菌を使用し、疎水性を測定した。菌を遠心 (3,000×g, 5分間) にて集菌した後、PUM buffer にて洗浄した後にさらに PUM buffer にて OD₆₄₀ が 0.5 になるように調製し、調製した菌液へ 200 μl のデカンを加えて攪拌した後に 5 分間静置し、OD₆₄₀ の値を測定した。疎水性は、デカンを加える前後の吸光度の減少率で評価した。

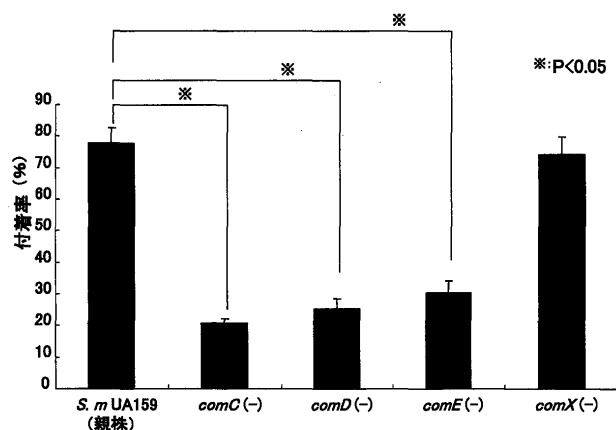


図7 スクロースを利用した試験管への付着率の比較

スクロースを利用した試験管への付着について親株および改変株で測定した。親株、改変株の対数増殖期の菌を遠心 (6,000×g, 20分間) にて集菌した後に、KPB 緩衝液にて OD₆₀₀ の値が 0.6 になるように菌液を調製した。試験管に調製した菌液を 2 ml と 5 % スクロース 2 ml を混合し、水平より 30 度に傾けて 37℃ で 18 時間反応させた。反応終了後、付着していない菌体を含んだ溶液を第二の試験管へ移した。菌体が付着している第一の試験管に KPB 緩衝液 3 ml を加え、第二、第三の試験管ともに超音波処理して均一な浮遊液とし、OD₅₅₀ を測定した。付着率は第一の試験管の OD₅₅₀ / (第一 + 第二 + 第三の試験管の OD₅₅₀) × 100 で計算した。

および *com* 遺伝子改変株で解析し、初期付着へ影響を与えるかどうか検討した。PAc の発現は、親株と比較して *comD* 遺伝子改変株、*comX* 遺伝子改変株で有意に減少した (図 8)。

2) Real-time PCR による *spaP* 発現量の定量

PAc をコードする *spaP* の発現量を Real-time PCR 法にて測定した。内部標準として、16s rRNA 遺伝子の発現量を測定し、各遺伝子の相対定量を行った。親株の発現量を 1 として比較した場合、*comC* 遺伝子改変株、*comE* 遺伝子改変株、*comX* 遺伝子改変株で 2 ~ 3 倍に、*comD* 遺伝子改変株で減少した (図 9)。

6. 親株および改変株のグルカン合成量測定

Quorum Sensing System 関連遺伝子がグルカンの合成に影響するかを解析するために、各 *com* 遺伝子改変株を用いて、48 時間培養後の培養液中の水溶性グルカンの合成量、不溶性グルカンの合成量、象牙質板に付着したグルカンの合成量を測定した。

培養液中における水溶性グルカンの合成量は、親株と比較すると、すべての *com* 遺伝子改変株において有意に減少した (図 10)。特に *comX* 遺伝子改変株では親株の約 5 % に減少していた (図 10)。培養液中における不溶性グルカンの合成量は、*comC* 遺伝子改変株において親株よりも有意に減少したが、*comD* 遺伝子改変株、*comE* 遺伝子改変株、*comX* 遺伝子改変株においては親

株よりも有意に増加した (図 11)。象牙質板に付着した不溶性グルカン合成量は、親株と比較して *comC* 遺伝子改変株、*comD* 遺伝子改変株、*comE* 遺伝子改変株において有意に低下し、特に *comE* 遺伝子改変株では親株の 40 % に減少した (図 12)。3 つのグルカン合成量を合わせた総量は、*comD*、*comX* 遺伝子改変株でほぼ変わらず、*comC*、*comE* 遺伝子改変株で低下し、とくに *comC* 遺伝子改変株において最大の低下を示した (図 13)。

7. *gtfB*, *gtfD*, *dexA* の mRNA 発現分析

不溶性グルカンの合成に関与している *gtfB*, 水溶性グルカンの合成に関与している *gtfD*, 不溶性グルカンを部分分解する *dexA* の mRNA 発現の解析を親株および各改変株の定常期の菌を使用して行った。*gtfB* の mRNA 発現は、親株と比較して *comD* 遺伝子改変株でほぼ同程度で、残りの改変株で増加した (図 14 上)。*gtfD* の mRNA 発現は、*comD* 遺伝子改変株で 0.8 倍に減少し、*comC* 遺伝子改変株、*comE* 遺伝子改変株、*comX* 遺伝子改変株では増加した (図 14 中)。*dexA* の mRNA 発現は親株と比較して、*comD* 遺伝子改変株でほぼ同程度で残りの改変株で増加した (図 14 下)。

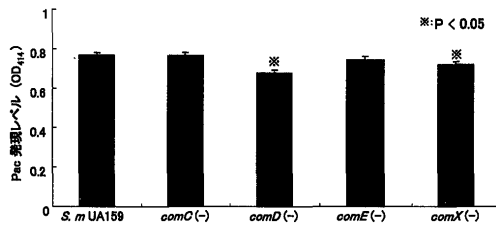


図8 定常期の親株および改変株のPac発現量の比較
Pacの発現は、モノクローナル抗体を用いてELISA法で測定した。

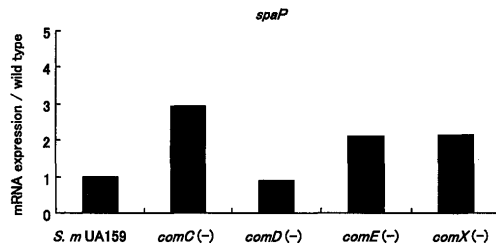


図9 定常期の親株および改変株の*spaP* mRNAの発現量の比較

Pacをコードする*spaP*の発現量をReal-time PCR法にて測定した。内部標準として、16s rRNA遺伝子の発現量を測定し、各遺伝子の相対定量を行った。親株(*S. mutans* UA159株)の発現量を1として比較した。

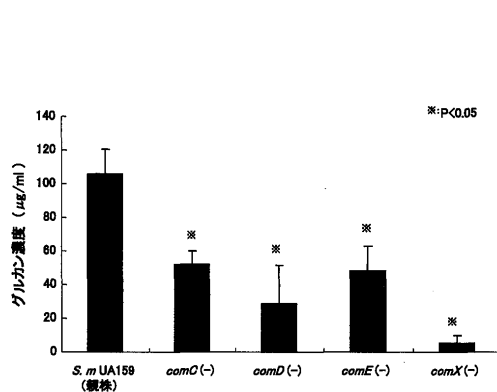


図10 親株および改変株の培養液中における水溶性グルカンの比較

EOG滅菌したウシ象牙質板を48穴プレートに親株あるいは*com*遺伝子改変株を37℃にて48時間培養後、フェノール硫酸法にて培養液中の水溶性グルカンの合成量を測定した。

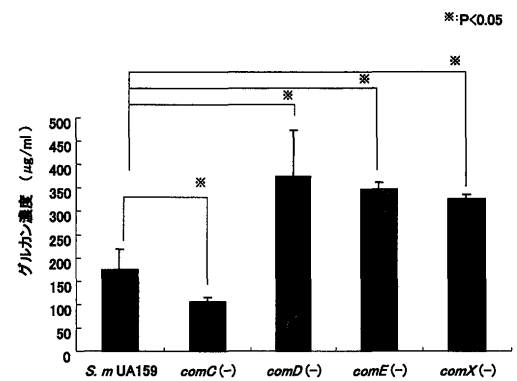


図11 親株および改変株の培養液中における不溶性グルカンの比較

EOG滅菌したウシ象牙質板を48穴プレートに親株あるいは*com*遺伝子改変株を37℃にて48時間培養後、フェノール硫酸法にて培養液中の不溶性グルカンの合成量を測定した。

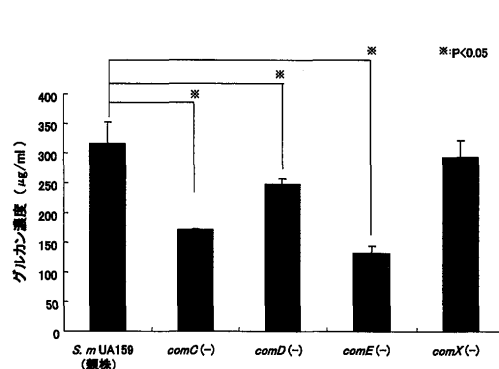


図12 親株および改変株の象牙質板に付着した不溶性グルカンの比較

EOG滅菌したウシ象牙質板を48穴プレートに親株あるいは*com*遺伝子改変株を37℃にて48時間培養後、フェノール硫酸法にて象牙質板に付着した不溶性グルカンの合成量を測定した。

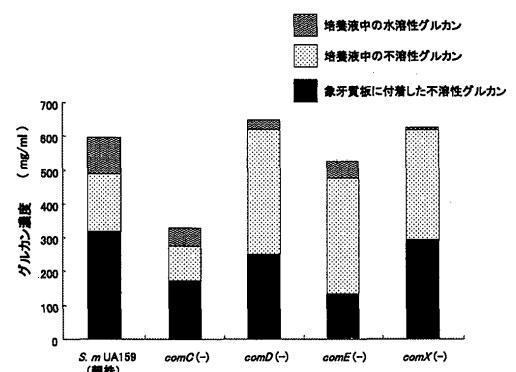


図13 親株および改変株のグルカン合成量の総量の比較
3つのグルカンすなわち培養液中の水溶性グルカン、培養液中の不溶性グルカン、象牙質板に付着する不溶性グルカンの合成量の総量を算出した。

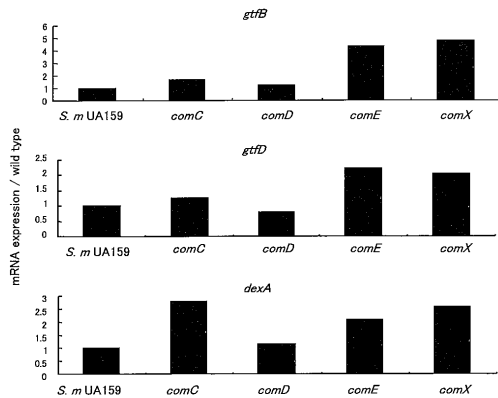


図14 定常期の親株および改変株の *gtfB* *gtfD* *dexA* の mRNA 発現量の比較

グルカン合成に関与している *gtfB*, *gtfD* およびグルカン分解に関与している *dexA* の mRNA の発現量を Real-time PCR 法にて測定した。内部標準として、16s rRNA 遺伝子の発現量を測定し、各遺伝子の相対定量を行った。親株 (*S. mutans* UA159 株) の発現量を 1 として比較した。*gtfB* の mRNA 発現は、親株と比較して *comD* 遺伝子改変株ではほぼ同程度で、残りの改変株で増加した (上)。*gtfD* の mRNA 発現は、*comD* 遺伝子改変株で 0.8 倍に減少し、*comC* 遺伝子改変株、*comE* 遺伝子改変株、*comX* 遺伝子改変株では増加した (中)。*dexA* の mRNA 発現は親株と比較して、*comD* 遺伝子改変株ではほぼ同程度で残りの改変株で増加した (下)。

8. 象牙細管径の増大率の測定

Quorum Sensing System が *S. mutans* の象牙細管への侵入に影響を及ぼすかを検討するために、親株および改変株による人工齲蝕象牙質モデルを作成し、その侵入の形態を観察することによって、象牙細管への侵入に及ぼす影響について調べた。象牙細管内における親株および改変株の形態観察するため、培養を終了した試料から作成した準薄切片にトルイジンブルー染色を施し光学顕微鏡で観察した。それぞれ菌株ごとに培養条件変化に伴う光学顕微鏡像を示す (図15)。すべての株で、スクロースを添加後に明らかに象牙細管の最大幅径の増大が認められた (図15)。象牙細管径の増大率を測定した結果を菌株ごとに比較したものを図16に、培養条件について比較したものを図17に示す。各改変株は、スクロースを添加した培養条件③において、培養条件①よりも象牙細管の増大率が大きかった (図16)。培養条件①および②では、すべての改変株で親株に比べ象牙細管の増大率が有意に少なかった (図17)。スクロースを添加した培養条件③においては親株と改変株の間で差は認められなかった (図17)。

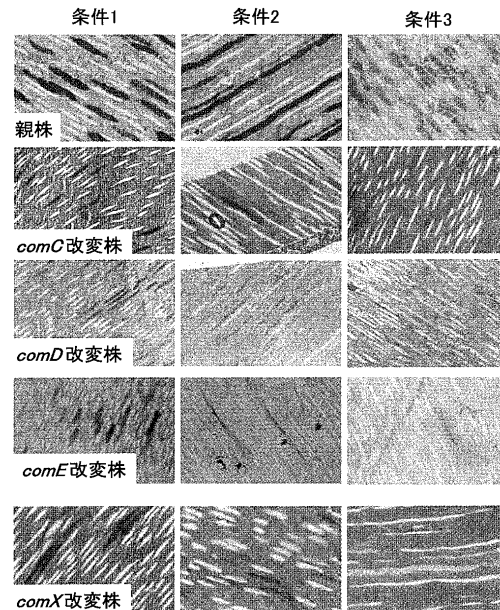


図15 親株および改変株の象牙細管への侵入形態
親株および改変株を BHI で 2 日ごとに培地を交換させながら 24 日間培養した (培養条件 1)。この試料の一部を Trypticase® Soy Broth without Dextrose (以下 D(-)TSB と略す) に移し 2 日間培養し (培養条件 2)、さらにその一部を 5 % スクロースを添加した D(-)TSB に移し 2 日間培養した (培養条件 3)。それぞれの条件より得られた試料の光学顕微鏡像を示した。

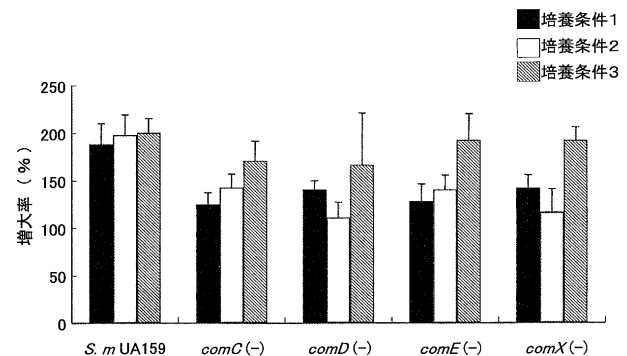


図16 親株および改変株を培養条件変化させた場合の象牙細管増大率の比較 (菌株別の比較)

親株および改変株を BHI で 2 日ごとに培地を交換させながら 24 日間培養した (培養条件 1)。この試料の一部を D(-)TSB に移し 2 日間培養し (培養条件 2)、さらにその一部を 5 % スクロースを添加した D(-)TSB に移し 2 日間培養した (培養条件 3)。それぞれの条件より得られた試料の光学顕微鏡像より、図 2 に示す方法で象牙細管の増大率を算出し。その結果、親株及び各改変株ともにスクロースを添加した培養条件 3 において培養条件 1 よりも象牙細管の増大率が大きかった。

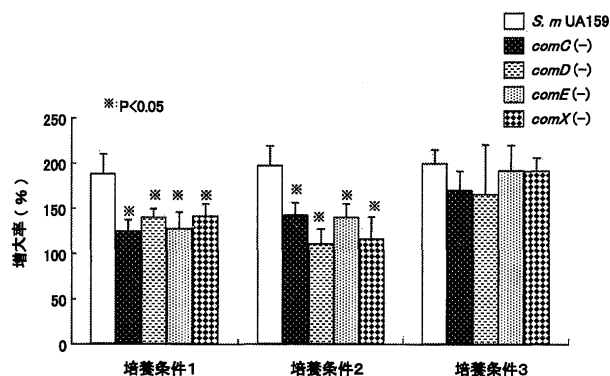


図17 親株および改変株を培養条件変化させた場合の象牙細管増大率の比較 (条件別の比較)

親株および改変株を BHI で 2 日ごとに培地を交換させながら 24 日間培養した (培養条件 1)。この試料の一部を D(-)TSB に移し 2 日間培養し (培養条件 2)、さらにその一部を 5 % スクロースを添加した D(-)TSB に移し 2 日間培養した (培養条件 3)。それぞれの条件より得られた試料の光学顕微鏡像より、図 2 に示す方法で象牙細管の増大率を算出し、その結果、培養条件 1 および 2 では、親株に比べてすべての改変株で象牙細管の増大率が有意に少なかった。スクロースを添加した培養条件 3 においては親株と改変株の間で差は認められなかった。

考 察

細菌は環境中における自身の細胞環境密度を感知し、それに応じて様々な遺伝子発現を制御していることが明らかになってきた³³⁾。この細胞密度感知機構は、Quorum Sensing System と呼ばれ、バイオフィルムの形成や、病原因子の発現など、感染症において非常に重要な働きをすることが明らかになっている⁴⁾。Quorum Sensing System は、シグナル分子により制御されており、レンサ球菌の場合は competence-stimulating peptide (CSP) と呼ばれる定数感知シグナル分子が報告されている³⁴⁾。CSP は細胞表面のレセプターに結合し、リン酸化によりその刺激は菌体内部に伝達される。具体的には、図 1 に示すようにシグナル分子である CSP をコードしている *comC* 遺伝子、receptor の *comD* 遺伝子、response regulator の *comE* 遺伝子、シグマファクターである *comX* 遺伝子により制御されている¹⁰⁾。これまで、*S. mutans* のバイオフィルム形成と Quorum Sensing System との関係については、CSP を欠失させた改変株では成熟したバイオフィルム形成が行われなかったとの報告¹¹⁾があるが、他の齲蝕病原性に影響を与えるか否かは明らかになっていない。本研究では、*S. mutans* においてどのような役割を果たしているかを明らかにするために、まず全遺伝子配列が報告されている *S. mutans*

UA159 株を親株として用い、Quorum Sensing System を制御している *comC*, *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子の改変株を作成した。次に親株と改変株を比較して初期付着、試験管への付着、グルカンの合成ならびに象牙細管への侵入を検討し、それらに Quorum Sensing System が関与しているか否かを検討した。

初期付着に関する解析においては、口腔内のペリクルの状態をより忠実に再現するために唾液をハイドロキシアパタイトにコーティングした。細菌の付着には、エナメル質表面の性状も大きな影響を与えるため、今回の実験では HA 板を用いた。初期付着はすべての *com* 遺伝子改変株で低下し、とくに *comD*, *comE* 遺伝子改変株で有意に低下した。このことは、Quorum Sensing System が初期付着というバイオフィルム形成あるいは齲蝕発生の初期段階において、既に影響を与えていることを示している。*com* 遺伝子改変株のバイオフィルム形成能が低下したり、バイオフィルムの質が脆弱化するという報告¹¹⁾があるが、今回示された初期付着の低下は、そのような現象の一因となっている可能性が考えられた。

プラーク細菌の菌面への付着には、細菌表層の構造および性質が関与しており、線毛、レクチン様リガンド、菌体表層の疎水性、粘着性多糖体、共凝集などがある。今回、初期付着がいずれの *com* 遺伝子改変株においても低下したことから、付着に関与する因子の一つである菌体表層の疎水性について解析した。親株および *comC*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株ではほぼ同程度の疎水性を示したが、*comD* 遺伝子改変株で疎水性が親株と比べて上昇する結果となった。*S. mutans* の Quorum Sensing System において CSP の receptor をコードする *comD* 遺伝子が、菌体表層の性質に影響を与えている可能性が示唆された。

次に、スクロースを添加した KPB 溶液にて、試験管の壁への付着を測定した。その結果、親株と比較して *comC*, *comD*, *comE* 遺伝子改変株の付着率が有意に低下した。このことより、先に示した初期付着だけでなくスクロースを利用した試験管への付着にも Quorum Sensing System が影響していると考えられた。*S. mutans* の菌面への付着、特に固着に関しては本菌の GTF によってスクロースから合成される不溶性グルカンが重要であることが明らかになっている。今回の結果から、スクロースを添加した KPB 溶液で 37℃、18 時間反応させる条件においては、*comC*, *comD*, *comE* 遺伝子を改変させることで、スクロースから合成される不溶性グルカンの産生が低下したことが推測された。本実験において、Quorum Sensing System を担う遺伝子を改変させたことによりスクロースを利用した試験管への付着が低下したことは、不溶性グルカンの産生に Quorum Sensing System が何らかの影響を与えていることを示唆している。

S. mutans の菌面への固着には、GTF の他に菌体表層タンパク質のいくつかが重要な役割を担っていることが

知られている³⁵⁻³⁷⁾。菌体表層タンパク質は、スクロース非依存性の付着に関与するものとスクロース依存性の付着に関与するものがある³⁸⁾。*S. mutans* の菌体表層物質の中で、分子量19万の線毛様タンパク質抗原は、スクロース非依存性の付着に関与し、同菌の歯面への付着にとって重要であると言われている。このタンパク質抗原は PAc, I/II²³⁾, B³⁹⁾, IF⁴⁰⁾, P1⁴¹⁾, MSL-1⁴²⁾ などさまざまな名称で呼ばれており、PAc に対するモノクローナル抗体を歯面に塗布すると、*S. mutans* の定着や齲蝕の発生が抑制されることが報告されている^{43, 44)}。本実験において、Quorum Sensing System を制御する遺伝子の改変株において初期付着が低下したが、この原因を検索する目的で、付着に重要な働きをする PAc の発現に関し、親株と改変株の間で差があるか否かを検討した。さらに、PAc をコードする *spaP* 遺伝子の発現についても検討した。ELISA で PAc の発現量を検討したところ *comD*, *comX* 改変株において PAc の発現量は、親株と比較して有意に減少していた。このことから、PAc をコードしている *spaP* 遺伝子の mRNA 量が *comD*, *comX* 改変株において親株と比較して少ないことが予想されたが、*comD* 遺伝子改変株は親株の 0.8 倍に減少していたものの、他の遺伝子改変株では親株より多い発現量を認めた。今回の実験では、定常期の菌体から RNA を抽出しているため、その時点での mRNA 量が菌体表層のタンパク量を正確に反映していない可能性も考えられる。この点についてはさらなる解析が必要である。

次に、齲蝕象牙質病巣におけるグルカン合成に Quorum Sensing System が関与しているかどうかを検討した。今回、ウシ象牙質板を用いた人工齲蝕象牙質板モデルを作製し、実験に用いた。ウシの歯は象牙細管の幅径がヒト象牙質に近く、ヒト象牙細管と代替できるといわれており⁴⁵⁾、これを使用することにより *in vivo* におけるヒト象牙質齲蝕病巣に近い条件での実験が可能である。*comC*, *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株を用いてグルカン合成量の変化を検索したところ、いずれの改変株においても親株と比較して象牙質板へ付着した不溶性グルカン量は低下した。とくに、*comC*, *comD*, *comE* 遺伝子改変株においては有意に低下した。このことは象牙質板に付着するような粘着性のグルカン合成に関して、これらの遺伝子が関与していることを示している。また、培養液中の水溶性グルカンの合成量は、すべての *com* 遺伝子改変株において有意に低下した。しかしながら、培養液中の不溶性グルカン合成量は、親株と比較して *comC* 遺伝子改変株では有意に低下したが、他の *com* 遺伝子改変株では増加した。培養液中の水溶性グルカン、培養液中の不溶性グルカン、象牙質板に付着したグルカンそれぞれのグルカン合成量を合計し、総量を算出したところ、*comC* 遺伝子改変株で親株の約 60% に減少したが、他の改変株では親株とほぼ同量となった。これらの結果は、Quorum Sensing System が *S. mutans* のグルカ

ン合成に関与していることを示している。また、培養液中の不溶性グルカンが改変株で増加したことは Quorum Sensing System が機能しなくなったことの結果と思われる。すなわち、親株では培養液中の水溶性グルカンと不溶性グルカンはほぼ同量であり、様々な遺伝子が働くことで均衡した状態であるといえるが、改変株では Quorum Sensing System が機能しなくなったことで、調整する機能が低下し、培養液中の不溶性グルカンの量が多くなったといえる。3 種類のグルカンの合成量が低下したことから、CSP の発現がグルカンの合成に関与していることが示唆された。また、今回 *comC*, *comE* 遺伝子改変株で象牙質板に付着した粘着性のグルカンの合成が少ない結果となった。Li らは、24 穴プレートにて *comC*, *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株を用いてバイオフィルムを形成させると、バイオフィルムの形成量が低下し、またバイオフィルムの構造が不完全であったと報告している¹¹⁾。緑膿菌においても、Quorum Sensing System 関連遺伝子をノックアウトした場合、バイオフィルムの量は変わらないが、親株が成熟したバイオフィルムを形成したのに対し、改変株では脆弱なバイオフィルムが形成されたという報告がある⁴⁶⁾。これらの事実は、*S. mutans* にとっても Quorum Sensing System が最適なグルカン合成、すなわちプラーク形成過程において重要な役割を果たしていることを支持するものである。

プラークの合成過程においては GTF によるグルカンの合成、DexA によるグルカンの分解が行われている。*comC*, *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株におけるグルカンの合成および分解の動態を明らかにするために親株および *com* 遺伝子改変株の GTF および DexA に関する遺伝子の発現に着目して検討した。今回、親株および *com* 遺伝子改変株の定常期の菌を使用し、*gtfB*, *gtfD*, *dexA* の mRNA 発現の量を比較した。不溶性グルカンの合成に関与するといわれている *gtfB* の発現量は親株と比較して、*comC*, *comD* 遺伝子改変株ではほぼ同量で、*comE*, *comX* 遺伝子改変株では親株の 3.5~4 倍に増加した。水溶性グルカンの合成に関与するといわれている *gtfD* の発現量は、親株と比べて *comD* 遺伝子改変株では若干減少したが、他の *com* 遺伝子改変株では増加した。不溶性グルカンを部分分解する *dexA* の発現は、親株と比べて *comD* 遺伝子改変株ではほぼ同量で、他の *com* 遺伝子改変株では増加した。先に示したグルカンの合成量の解析結果とあわせて検討すると、*com* 遺伝子改変株では、グルカン合成に関与する mRNA の発現が減少し、グルカン分解に関与する mRNA の発現が増加することが予想されていたが、本実験において予測と異なる結果が示された。本実験では定常期の菌を用いて mRNA の発現を測定したが、グルカン合成量の検討を行ったウシ象牙質板、48 時間およびスクロースを添加した培地での培養と条件が異なっていたことが影響していた可能性が考えられる。また、同じ定常期の菌でも浮遊状態にあるものと

象牙質板に付着した状態という条件の違いにより、各種遺伝子発現の様式が異なったという可能性もあるため、今後、よりグルカン合成量の検討を行った条件に近い状態の mRNA 発現の解析が必要であると思われる。

S. mutans の Quorum Sensing System が象牙質侵入にどのように影響を及ぼすかについて検討する目的で、人工齲蝕象牙質モデルへの親株および *com* 遺伝子改変株の侵入状態を比較した。光学顕微鏡像より測定した象牙細管の直径は、いずれの菌株及び培養条件においても、菌の侵入が認められる細管において増大していた。その増大率はすべての株で、5%スクロースの添加により大きくなる傾向を示した。また、24日間 BHI 培養時において親株と比較してすべての *com* 遺伝子改変株の象牙細管の増大率は有意に減少していた。5%スクロースが添加されると菌株間での違いは認められなかった。このことは、栄養が十分ある条件下では、Quorum Sensing System の有無に関わらず増殖および象牙細管の拡張や脱灰が可能であるが、栄養が十分でない条件においては Quorum Sensing System が影響を及ぼしている可能性を示している。Quorum Sensing System は環境変化への適応機構としても報告されており¹⁶⁾、特に *S. mutans* の酸耐性機構については Quorum Sensing System が発動することで酸性環境に対して適応状態となり、培養液の pH が3近くに近づくまで増殖することが可能であるとされる⁴⁷⁾。象牙細管は、物理的に極めて狭小な空間であるために十分な栄養が供給されづらい環境であると考えられ、Quorum Sensing System の有無により培養条件① (BHI 24日間培養) および② (BHI 24日間+TSB 2日間培養) で親株と改変株の違いが生じたものと考えられた。

今回、Quorum Sensing System が *S. mutans* の初期付着、試験管への付着、グルカン合成および齲蝕象牙細管への侵入に影響を及ぼしていることが明らかとなったが、CSP のレセプターがもう一つ存在するという報告^{48, 49)}や、バイオフィーム形成に関与が少ないと言われてきた AI-2 に関与する *luxS* 遺伝子欠損株においてバイオフィーム形成能が低下するという報告もなされている⁵⁰⁾。今後、さらに *S. mutans* の Quorum Sensing System に関する解析をすることが、このシステムをターゲットにした新しい齲蝕予防法や治療法の開発につながると考えられる。

結 論

S. mutans における Quorum Sensing System の働きを解明するために、このシステムを制御する *com* 遺伝子改変株を用いて検討し、以下のような結果を得た。

1. *comC*, *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株は、唾液をコーティングしたハイドロキシアパタイトに対する初期付着が低下した。特に *comD*, *comE* 遺伝子改変株は有意に低下した。また、*comD* 遺伝子改変株の菌体表面は親株と比較して疎水性が上昇した。
2. *comC*, *comD*, *comE* 遺伝子改変株は親株と比較し、

スクロースを利用した試験管への付着が有意に減少した。付着に重要な働きをしている PAc および PAc をコードする *spaP* の発現は、親株と *com* 遺伝子改変株で有意な違いは認められなかった。

3. グルカン合成量について

培養液中の水溶性グルカンは、すべての *com* 遺伝子改変株で有意に減少した。培養液中の不溶性グルカンは親株と比べて *comD*, *comE*, *comX* 遺伝子改変株は増加したが、*comC* 遺伝子改変株では有意に減少した。象牙質板に付着した不溶性グルカンは、すべての *com* 遺伝子改変株で減少した。特に *comC*, *comD*, *comE* 遺伝子改変株で有意な減少が認められた。グルカン合成総量は、*comC* 遺伝子改変株で親株と比べ45%の減少が認められた。残りの改変株に付いては、ほとんど違いが認められなかった。しかし、3種類のグルカン合成総量の中でそれぞれのグルカンの比率において、培養液中の不溶性グルカンの比率が増加し、象牙質板に付着するような粘着性の不溶性グルカンの比率が減少した。

4. 象牙細管への侵入による増大率は、BHI 培地のみで培養した場合、すべての *com* 遺伝子改変株で親株よりも有意に減少していた。

以上の結果より、*S. mutans* の Quorum Sensing System は、う蝕病原性に重要と思われる初期付着・グルカン合成・象牙細管への侵入能に影響を及ぼしていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導と御校閲を賜りました歯科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに、御校閲後助言を戴いた口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授、予防歯学分野 伊藤博夫教授に深謝いたします。また、直接御指導とご助言を戴いた、歯科保存学分野 尾崎和美講師、口腔感染症学分野 村上圭史博士に感謝致します。また、快く実験の補助をして戴いた医学部保健学科の野間保喜氏に感謝いたします。最後に、数々の御教示と御援助を戴いた歯科保存学分野の諸先生方に深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 50, 353-380 (1986)
- 2) Bender GR, Sutton SV and Marquis RE: Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. Infect Immun 53, 331-338 (1986)
- 3) Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Svic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA and Ferretti JJ: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl

- Acad Sci USA 99, 14434-14439 (2002)
- 4) Fuqua WC, Winans SC and Greenberg EP: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269-275 (1994)
- 5) Sitnikov D, Schineller JB and Baldwin TO: Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 17, 801-812 (1995)
- 6) Greenberg EP: Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News* 63, 371-377 (1996)
- 7) De Kievit TR and Iglewski BH: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68, 4839-4849 (2000)
- 8) Surette MG: Quorum sensing in *Escheria coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1639-1644 (1999)
- 9) Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP and de Vos WM: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24, 895-904 (1997)
- 10) Dunne G and Leonard BAB: Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 51, 527-564 (1997)
- 11) Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PCY, Lee JH, Ellen RP and Cvitkovitch DG: A quorum sensing system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 184, 2699-2708 (2002)
- 12) Lee MS and Morrison DA: Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* 181, 5004-5016 (1999)
- 13) Petersen FC and Scheie AA: Genetic transformation in *Streptococcus mutans* requires a peptide secretion-like apparatus. *Oral Microbiol Immunol* 15, 329-334 (2000)
- 14) Wen ZT and Burne RA: Functional genomics approach to identifying gene required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 68, 1196-1203 (2002)
- 15) Li YH, Hanna MN, Sevensater G, Ellen RP and Cvitkovitch DG: Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilm. *J Bacteriol* 183, 6875-6884 (2001)
- 16) Wen ZT and Burne RA: LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress and biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 2682-2691 (2004)
- 17) Ahn SJ, Wen ZT and Burne RA: Multilevel control of competence development and stress tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infect Immun* 74, 1631-1642 (2006)
- 18) Taniguchi K, Ono T, Murakami K, Viducic D, Kayama S, Hirota K, Nemoto K and Miyake Y: A novel gene of *Pseudomonas aeruginosa* that suppresses tolerance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2997-3001 (2003)
- 19) Gaines S, James TC, Folan M, Baird AW and O'Farrelly C: A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. *J Microbiol Methods* 54, 315-323 (2003)
- 20) Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H and Iwaki M: Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun* 58, 289-296 (1990)
- 21) Rosenberg M, Gutnick D and Rosenberg E: Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 9, 29-33 (1980)
- 22) Hamada S and Torii M: Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun* 20, 592-599 (1978)
- 23) Hamada S and Torii M: Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Infect Immun* 32, 364-372 (1981)
- 24) Fernandez EJ: *Streptococcus mutans* serotype c-specific determinant in the surface protein antigen I/II. *四国歯誌* 6, 79-93 (1993)
- 25) Kelly C, Evans P, Bergmeier L, Lee SF, Progulsk-Fox A, Harris AC, Aitken A, Bleiweis AS and Lehner T: Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. *FEBS Lett* 258, 127-132 (1989)
- 26) Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F and Fukui K: Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of *spaP* gene. *J Med Microbiol* 41, 231-235 (1994)
- 27) 末延 慎司: 人工齲蝕象牙質における *Streptococcus mutans* の動態に関する研究. *四国歯誌* 18, 161-176 (2005)
- 28) Nisizawa T, Imai S, Akada H, Hinode M and Araya S: Extracellular glucans produced by oral streptococci. *Arch Oral Biol* 21, 207-213 (1976)
- 29) Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Robers PA and Smith F: A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168, 167 (1951)
- 30) Alaluusua S, Gronroos L, Zhu X, Saarela M, Matto J, Asikainen S and Fukushima K: Production of

- glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. Arch Oral Biol 42, 417-422 (1997)
- 31) Hanada N and Kuramitsu HK: Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent glucan synthesis. Infect Immun 57, 2079-2085 (1989)
 - 32) Hamada S and Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44, 331-384 (1980)
 - 33) Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ and Salmond GP: Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev 25, 365-404 (2001)
 - 34) Davies DG Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW and Greenberg EP: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280, 295-298 (1998)
 - 35) Qian H and Dao ML: Inactivation of the *Streptococcus mutans* wall-associated protein A gene (*wapA*) results in a decrease in sucrose-dependent adherence and aggregation. Infect Immun 61, 5021-5028 (1993)
 - 36) Banas JA, Russell RR and Ferretti JJ: Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* ingbritt. Infect Immun 58, 667-673 (1989)
 - 37) Rolla G, Oppermann RG, Bowen WH, Ciardi JE and Knox KW: High amount of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. Caries Res 14, 235-238 (1980)
 - 38) Koga T, Yamashita Y, Nakano Y, Kawasaki M, Oho T, Yu H, Nakai M and Okahashi N: Surface proteins of *Streptococcus mutans*. Dev Biol Stand 85, 363-9 (1995)
 - 39) Russel RR: Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 114, 109-115 (1979)
 - 40) Hughes M, Machardy SM, Sheppard AJ and Woods NC: Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. Infect Immun 27, 576-588 (1980)
 - 41) Kelly C, Evans P, Ma JK, Berqmeier LA, Taylor W, Brady LJ, Lee SF, Bleiweis AS and Lehner T: Sequencing and characterization of the 185kDa cell surface antigen of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 35, 335-385 (1990)
 - 42) Demuth DR, Lammey MS, Huck M, Lally ET and Malamud D: Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. Microb Pathog 9, 199-211 (1990)
 - 43) Lehner T, Caldwell J and Smith R: Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. Infect Immun 50, 796-799 (1985)
 - 44) Ma JK, Smith R and Lehner T: Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. Infect Immun 55, 1274-1278 (1987)
 - 45) Schilke R, Lisson JA, Bauss O and Geurtsen W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. Arch Oral Biol 45, 355-361 (2000)
 - 46) Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW and Greenberg EP: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280, 295-298 (1998)
 - 47) 花田信弘: ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学. 東京, クインテッセンス出版, 28-46 (2003)
 - 48) Cvitkovitch DG, Li YH and Ellen RP: Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. J Clin Invest 112, 1626-1632 (2003)
 - 49) Suntharalingan P and Cvitkovitch DG: Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. Trends Microbiol 13, 3-6 (2005)
 - 50) Yoshida A, Ansai T, Takehara T and Kuramitsu HK: LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 71, 2372-2380 (2005)